

# 第8回 CLA懇話会



〰 懇話会代表 菅野道廣 九州大学名誉教授  
第8回世話人 宮澤陽夫 東北大学教授  
池田郁男 東北大学教授 〰

場所：仙台市情報・産業プラザ

日時：平成18年10月7日（土）13時30分より

## 第8回 CLA 懇話会 講演会要旨集

(一般公演時間 15 分、討論時間 5 分)

講演会 (仙台市情報・産業プラザ (アエル6F) セミナールーム (2))

13:30~17:25

座長 池田郁男 (東北大院・農)

13:30

- 1) 代表世話人挨拶：第8回 CLA 懇話会に当たって  
○菅野道廣 (九州大・熊本県立大名誉教授)

13:45

- 2) 共役リノール酸含有リン脂質の酵素的合成  
○山本幸弘・細川雅史・宮下和夫 (北海道大院・水産)

14:05

- 3) 乳酸菌を用いた共役リノール酸 (CLA) 生産に関与するタンパク質の同定  
○岸野重信<sup>1, 2</sup>、小川順<sup>2</sup>、横関健三<sup>1</sup>、清水昌<sup>2</sup>  
(京大院農・産業微生物<sup>1</sup>、京大院農・応用生命<sup>2</sup>)

座長 細川雅史 (北海道大院・水産)

14:25

- 4) CLA の酸化安定性と酸化生成物に関する研究  
○仲川清隆<sup>1</sup>、都築毅<sup>2</sup>、宮澤陽夫<sup>1</sup> (東北大院農<sup>1</sup>、宮城大・食産業<sup>2</sup>)

14:45

- 5) 牛肉中の共役リノール酸 (CLA) の変化：モデル系における加熱処理の影響  
○古賀民穂<sup>1</sup>、尾崎加奈<sup>2</sup>、宮城一菜<sup>2</sup>、島居真紀<sup>2</sup>、藤瀬朋子<sup>2</sup>、太田英明<sup>2</sup>  
(中村学園大短大<sup>1</sup>、中村学園大・栄養科学<sup>2</sup>)

15:05

- 6) CLA 摂食マウスの食事誘発性脂肪萎縮症モデルへの応用  
○永尾晃治、井上奈穂、宇治野陽子、柳田晃良  
(佐賀大・農・生機科)

15:25～15 : 45

休 憩

座長 永尾晃治 (佐賀大・農)

15 : 45

7) 共役リノール酸を含む構造脂質の脂質代謝への影響

-OLETF ラットでの検討-

小関 友紀子<sup>1</sup>、遠藤泰志<sup>1</sup>、○池田郁男<sup>1</sup>、永尾寿浩<sup>2</sup>、島田裕司<sup>2</sup>

(東北大院・農・生体分子機能学<sup>1</sup>、大阪市工研<sup>2</sup>)

16 : 05

8) CLA による低酸素ストレス応答抑制

○山崎正夫、松山哲也、池保有理、西山和夫 (宮崎大・農)

16 : 25

9) CLA の肝癌細胞増殖抑制作用とペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) の関係

○柴田央<sup>1</sup>、都築毅<sup>2</sup>、宮澤陽夫<sup>1</sup> (東北大院・農<sup>1</sup>、宮城大・食産業<sup>2</sup>)

座長 山崎正夫 (宮崎大・農)

16 : 45

1 0) 海藻に含まれる共役型高度不飽和脂肪酸

○朴時範<sup>1</sup>・遠藤泰志<sup>1</sup>・池田郁男<sup>1</sup>・藤本健四郎<sup>2</sup>

(東北大院・農・生体分子機能学<sup>1</sup>・郡山女子大・家政<sup>2</sup>)

17 : 05

1 1) 共役リノレン酸のラット小腸における共役リノール酸への代謝転換

○都築毅<sup>1</sup>、川上祐生<sup>2</sup>、仲川清隆<sup>2</sup>、古場一哲<sup>3</sup>、今村順<sup>4</sup>、岩田敏夫<sup>5</sup>、池田郁男<sup>6</sup>、宮澤陽夫<sup>2</sup>

(宮城大・食産業<sup>1</sup>、東北大院・農・機能分子<sup>2</sup>、

長崎シーボルト大・看護栄養<sup>3</sup>、玉川大・農<sup>4</sup>、

日清オイリオグループ<sup>5</sup>、東北大院・農・生体分子機能学<sup>6</sup>)

18:00～20:00

懇親会 (仙台アエル聘珍楼)

# 1)

## 第 8 回 CLA 懇話会に当たって 代表世話人 菅野道廣 (九州大学・熊本県立大学名誉教授)

本懇話会も第 8 回の会合を持つに至り、年毎に盛会裏に進展してきましたが、わが国ではヒトを対象とした臨床試験が未だに行われておらず、基礎研究の域を出ないのは残念です。日本人の脂質摂取状況は先進国のなかでは非常に特異的であり、欧米諸国での成績をそのまま鵜呑みすることはできそうにもありません。

一方、CLA に関しては未だに多くの基本的諸問題が解明されておらず、なかでも CLA 標品中の二種の異性体の生理効果と両者の最適協調条件に関する情報が欠けているようです。動物種による効果の差の原因はどこにあるのか、臓器特異性などもまだはつきりしませんし、摂取効果を強めて安全性を高める試みも十分ではありません。このような曖昧さを残しながら、すでにわが国でも、いわゆる「健康食品」として CLA が市場に出回っています。

CLA 懇話会を立ち上げるに当たって、垣根のない討論ができることを一つの柱とし、そのこと自体はかなり深化してきていると思われませんが、残念ながら「日本発の画期的新知見」は限られているとしか言えない状況にあるのではないのでしょうか。いろいろな分野の研究者からの情報をうまく活かして、是非とも世界の注目を集める業績を得たいものです。

さて、ノルウエーでの第 1 回会議から随分と時間が過ぎましたが、第 2 回 CLA 国際会議が、2007 年 9 月 20 日～24 日、イタリアの Sardinia で開催される運びとなりました（会頭 S. Banni.）現在準備委員会（S. Banni, K. Erickson, M. Griinari, M.W. Pariza, M. Sugano 及び K. Wahle）で大枠を定め、世界中の研究者の参加を呼びかけることにしています。日本的な内容も包含できるように意見を述べています。そして、第 3 回の会議の候補地として日本とカナダが上がっていますので、是非とも多数の方々に参加されることを期待しています。Sardinia は風光明媚な島と聞き、十分満足でけるものと思います。

## 2)

### 共役リノール酸含有リン脂質の酵素的合成

○山本幸弘・細川雅史・宮下和夫  
(北海道大学大学院水産科学院)

#### 【序論】

共役リノール酸 (CLA) が抗癌作用や抗肥満作用などの優れた生理作用を有することが、多数の報告例により示されている。しかしながら、これらの CLA の生理作用に関する報告は遊離脂肪酸形態によるものがほとんどである。脂質の機能や吸収は脂質形態により大きく異なることがわかっているため、CLA に関しても同様に、リン脂質やトリグリセリドといった実用的な脂質形態の機能に興味を持たれる。特に、リン脂質は優れた両親媒性を有することから食品乳化剤、リポソーム基材、更には CLA の作用機構を解明するための実験ツールとしての利用など、様々な分野で利用が期待できる脂質形態である。そこで本研究では CLA の広範な利用が期待できる CLA 含有リン脂質の合成を行い、その至適反応条件について検討した。

#### 【方法】

リゾホスファチジルコリン 11 mg と CLA 18 mg をグリセロール 550 mg に分散させ、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 3.3x10<sup>4</sup> U, CaCl<sub>2</sub> 0.3 μmol に、水または必須水代替物としてホルムアミド 50 μl を加えて反応を行った。一定時間反応後、クロロホルム：メタノール：水 (10:5:3, v/v/v) の液-液分配にてクロロホルム層より脂質画分を回収し、HPLC 分析あるいは GC 分析にて合成率を算出した。至適反応条件を明らかにするため、基質 CLA 添加量やホルムアミド添加量、グリセロール添加量、PLA<sub>2</sub> 添加量の影響を調べた。

#### 【結果と考察】

これまでに報告した DHA 含有リン脂質の合成と同じように、必須水代替物であるホルムアミドを用いることで合成率は大幅に上昇した。至適反応条件は LPC 11 mg に対しそれぞれ、基質 CLA 添加量が 72 mg, ホルムアミド添加量が 200 μl, グリセロール添加量が 550 mg, PLA<sub>2</sub> 添加量が 5.5x10<sup>3</sup> U, 反応時間が 6 時間であった。また至適反応条件下における合成率は 65 mol% に達した。反応開始から 24 時間以降に合成率の低下が見られたが、反応液にアルブミンなどのタンパク質を添加することで合成率の低下を抑制できることが明らかとなった。また各種 CLA 異性体を用いて合成率を比較検討した結果、異性体間で合成率が異なり、10*t*, 12*c*-CLA で最も合成率が高くなったことより、CLA の立体構造の違いが合成率に影響を与えることが示唆された。

### 3)

#### 乳酸菌を用いた共役リノール酸（CLA）生産に関するタンパク質の同定

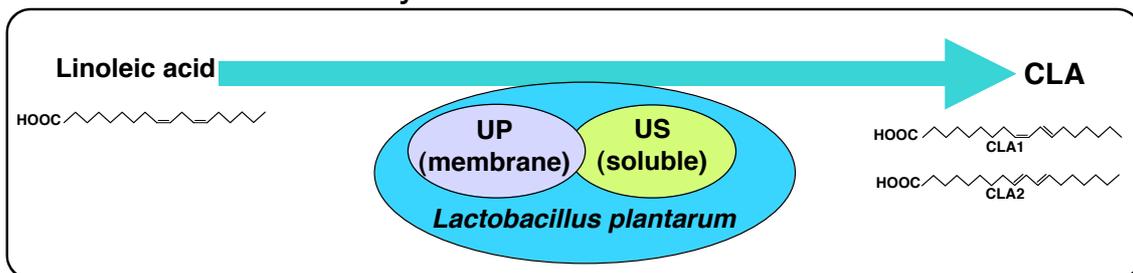
岸野重信<sup>1、2</sup>、小川順<sup>2</sup>、横関健三<sup>1</sup>、清水昌<sup>2</sup>

(1 京大院・農・産業微生物、2 京大院・農・応用生命)

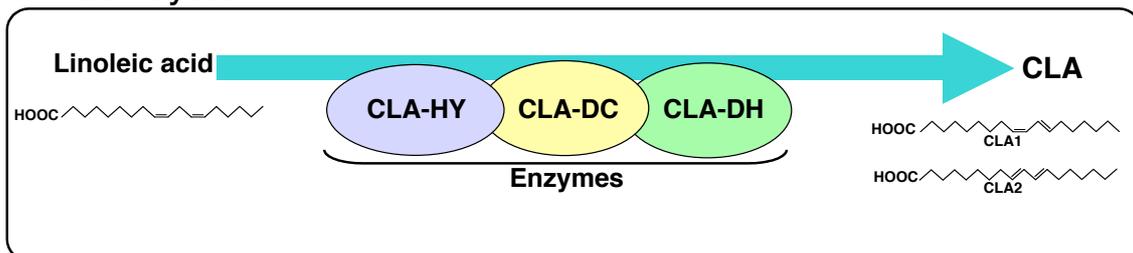
【目的】我々は、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU1009a を用いることによりリノール酸を効率よく CLA へと変換できることを報告している。さらに、本菌より得た cell-free extract (CFE) を用いても反応が進行することより、本反応に関与するタンパク質の同定を試みた。本菌の CFE を超遠心し、膜画分(UP)と可溶性画分(US)とに分画した結果、本変換反応に必要なタンパク質が両画分に分散していることを明らかにした。さらに膜画分(UP)に一つ、可溶性画分(US)に二つ、本反応に関与するタンパク質が存在することを明らかにした。そのうち、膜画分(UP)に存在するタンパク質(CLA-HY)、可溶性画分(US)に存在するタンパク質の一つ(CLA-DH)を同定した。本研究では、可溶性画分(US)に存在する未同定タンパク質の精製・同定を行った。

【方法・結果】CLA-HY 及び CLA-DH 発現大腸菌を作成し、各タンパク質を高発現した発現大腸菌の CFE 共存下にて、本乳酸菌の可溶性画分(US)に存在する CLA 生産活性の発現に必要なタンパク質を、各種クロマトグラフィーを用い精製し、N 末端アミノ酸配列を決定した。本アミノ酸配列情報をもとにプライマーを作成し、*L. plantarum* AKU 1009a より抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR を行った結果、846 bp の遺伝子断片が増幅された。本タンパク質(CLA-DC)を高発現する形質転換大腸菌を作成し、CLA-HY・CLA-DH との相補試験を行ったところ、本遺伝子産物(CLA-DC)は、*L. plantarum* AKU 1009a の可溶性画分に存在する CLA 生産酵素系に関わるタンパク質の一部の機能を代替しうることが判明した。これにより、我々が構築した乳酸菌 *L. plantarum* AKU 1009a を用いるリノール酸からの CLA 生産システムは、それぞれの遺伝子を発現した三つの発現大腸菌を用いることにより再現可能となった。

#### Lactic acid bacteria system



#### *E. coli* system



## 4)

### CLA の酸化安定性と酸化生成物に関する研究

○仲川清隆<sup>1</sup>、都築毅<sup>2</sup>、宮澤陽夫<sup>1</sup>(東北大院・農<sup>1</sup>、宮城大・食産業<sup>2</sup>)

【目的】バターやチーズなどの乳製品に含まれている共役ジエン構造を有する共役リノール酸 (CLA) については、抗肥満効果や抗腫瘍性などの有効性が注目されている。食品に CLA を応用する上で形状 (遊離型やエステル型) や異性体による酸化劣化の受け易さの違いや酸化生成物の理解は重要と思われる。CLA は異性体によって生理作用に大きな違いがある。よって、幾何、位置異性により、酸素との反応性に大きな違いがあると推定される。本研究では、様々な形状の CLA や CLA 異性体間による酸化安定性、酸化生成物であるフラン酸の生成量を検討した。

【方法】非共役型脂肪酸であるリノール酸 (LA) と CLA(9c,11t-18:2、10t12c-18:2、9t,11t-18:2)を 37°C、暗所で自動酸化させた。その後、酸素吸収量を測定し、抗酸化剤である BHT で反応を止め、ヒドロペルオキシド量、TBARS 値、GLC による残存脂肪酸量の変化を測定した。また、遊離型脂肪酸とエステル型脂肪酸 (トリアシルグリセロール型やメチルエステル型) についてもその酸化安定性を比較した。さらに、CLA の酸化生成物であるフラン酸の構造を GC-EI/MS で決定し、フラン酸量を GLC によって測定した。

【結果】GLC 分析の結果、遊離型では 10t12c-CLA、9c,11t-CLA、9t,11t-CLA、LA の順に速く酸化された。しかし、CLA は LA と比べてヒドロペルオキシドや TBARS の増加はほとんど認められなかった。これにより CLA を含む油脂の酸化進行度を測定する場合は、GLC 分析により直接残存脂肪酸量を測定するのが良いと考えられた。GC-EI/MS 分析で 9c,11t-CLA から生成するフラン酸の構造を 9,12-epoxy-9,11-octadecadienoic acid、10t,12c-CLA から生成する物を 10,13-epoxy-10,12-octadecadienoic acid、9t,11t-CLA から生成する物を 9,12-epoxy-9,11-octadecadienoic acid と決定した。そして、9c,11t-CLA や 10t,12c-CLA と比べて 9t,11t-CLA から生成されるフラン酸の生成割合が高いことが明らかとなった。一方、CLA をトリアシルグリセロール型にすると遊離型より安定になり、メチルエステル型にするとより安定となった。フラン酸の生成割合は、メチルエステル型、遊離型、トリアシルグリセロール型の順で高く、形状によってその生成割合が変わることが明らかとなった。CLA の酸化生成物であるフラン酸は、CLA より親和性の高い PPAR リガンドになるという報告もあることから、生体への応用を考えた場合、酸化安定性と生理機能の両方を考慮し、形状を決める必要があると考えられた。

## 5)

### 牛肉中の共役リノール酸（CLA）の変化：モデル系における加熱処理の影響

（中村学園大学短期大学部、\*中村学園大学栄養科学部）○古賀民穂、\*尾崎加奈 \*宮城一菜、\*島居真紀、\*藤瀬朋子、\*太田英明

（目的）リノール酸の幾何および位置異性体である共役リノール酸（CLA）は発ガン抑制、抗アレルギー、体蛋白増加、体脂肪減少など多くの生理作用が見出され、一般食品からの CLA 摂取量の増加が要望されている。先にフライパン焼きなどの加熱処理によって牛肉中の CLA 量が増加することを見出し報告した。その生成機構を解明する一環としてリノール酸や精製タンパク質からなるモデル系を作成して、検討した。

（方法）材料に和牛モモ肉を使用し、加工調理は家庭用電子レンジ（600W、2450MHz）による加工と電気プレートを用いたテフロン加工フライパン加熱処理の 2 方法とした。モデル系としてはリノール酸（和光純薬製）および牛アルブミン（脱脂済み）を用い、モデル系①として、2%リノール酸-ヘキサン溶液、②としてアルブミンを 50mM 緩衝液に溶解後、20%リノール酸-ヘキサン溶液 1ml を混合した系 ③としてリノール酸-アルブミン複合体（黄色粉末）を用いた。脂肪の抽出は C:M (2:1)にて行い、CLA 分析は DMSO を添加後、硫酸メタノール法でメチル化し、SUPELLOWAX™-10 (60m X 0.32mm X 0.25 μ) カラムにて GLC 分析した。

（結果）電子レンジ加熱処理においては総 CLA 量が減少することを確認した。フライパン加熱処理では加熱時間が増すに従い分析したどの異性体も増加し、総 CLA 量は増加傾向にありました。この増加には PH の影響は認められませんでした。最も牛肉素材に近いリノール酸-アルブミン複合体の加熱処理において、all trans, 9c11t の増加、もっとも生理効果が高いとされる 10t12c および 9c11c の生成がみられ、そのことにより総 CLA 量の著しい増加が観察された。加熱処理による CLA の増加には共存するアルブミン（蛋白質）が大きく関与していると推察された。

## 6) CLA 摂食マウスの食事誘発性脂肪萎縮症モデルへの応用

○永尾晃治、井上奈穂、宇治野陽子、柳田晃良

(佐賀大学・農・生機科)

### [目的]

脂肪萎縮症 (Lipodystrophy) は、極度の脂肪萎縮が原因となり重度のインスリン抵抗性、高中性脂肪血症、脂肪肝を発症する病態である。以前から、共役リノール酸 (CLA) をマウスに摂取させると lipodystrophy 様病態を誘発することが報告されている。これは、CLA に対するマウスの極めて高い応答性が脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌を過度に抑制するためと考えられている。本研究では、アディポサイトカインの一つであるレプチン投与が、CLA 誘発性 lipodystrophy 様病態モデルマウスの脂質代謝に及ぼす影響について検討を行った。

### [方法]

C57BL/6N マウスに基準食 (サフラワー油 6%) もしくは CLA 食 (サフラワー油 4%+CLA 2%) を与えた 2 群を設けて 3 週間飼育した。その後、基準食摂取マウスもしくは CLA 食摂取マウスに PBS を投与した群、CLA 食摂取マウスにレプチンを投与した群を設け、1 週間腹腔内投与を行った後に心臓採血により屠殺を行った。

### [結果]

白色脂肪組織重量は、CLA 摂食による低下が認められたが、その低下作用にレプチン投与は影響を及ぼさなかった。一方、CLA 誘発性 lipodystrophy 様病態は、レプチン投与により顕著な改善が認められた。高インスリン血症、脂肪肝に対する改善作用には、インスリン感受性亢進、肝臓トリグリセリド合成関連酵素活性の抑制が関与していることが示唆された。

### [考察]

今後、この食餌誘発性脂肪萎縮症モデルを用いることで、脂肪肝改善作用をもたらす食事成分の検索・評価が行われることが期待される。

## 7)

共役リノール酸を含む構造脂質の脂質代謝への影響 -OLETF ラットでの検討-

小関 友紀子<sup>1</sup>、遠藤泰志<sup>1</sup>、○池田郁男<sup>1</sup>、永尾寿浩<sup>2</sup>、島田裕司<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東北大院農・生体分子機能学、<sup>2</sup>大阪市工研

【目的】共役リノール酸(CLA)はリノール酸(18:2n-6)の位置および幾何異性体であり、共役ジエン構造を持つ。CLA は脂質代謝改善作用、体脂肪減少作用、発ガン抑制作用など様々な生理作用を示すがその作用機構は不明な点が多い。構造脂質とは、トリアシルグリセロール(TG)のグリセリンの特定の位置に特定の脂肪酸が結合したものをさす。脂肪酸の結合位置の違いにより生理作用が異なる場合がある。そこで本研究では、CLA 摂取により体脂肪減少が見られた OLETF ラットを用い、TG 中で CLA の位置が sn-1 (3) 位または 2 位であるときの CLA の体脂肪減少効果が異なるかを調べることを目的とした。

【方法】CLA を含む構造脂質は CLA が sn-1 (3) 位または sn-2 位に結合し、その他の位置にカプリル酸(8:0)が結合した CLA-8-8 (C88 群) および 8-CLA-8 (8C8 群) を用いた。さらに CLA のみが結合した CLA-TG と 8:0 のみの TG である 8-8-8 を 1:2 で混合した群を設けた (TG 群)。対照群では CLA の代わりにリノール酸を用いた (LA 群)。各食餌脂肪をハイオレイックサフラワー油と混合し、CLA の割合が食餌中 1% となるように調製し、総 18:2 量を同量とした。雄性 OLETF ラット 5 週齢を用い、1 週間の予備飼育後平均体重の等しい 4 群 (各 6 匹) に分け、AIN-93G 配合に準じた試験食 (油脂含有率 10%) を与え、3 週間飼育した (水、エサは自由摂食)。飼育最終日早朝よりラットは約 6 時間絶食し、ジエチルエーテル麻酔下で腹部大動脈からの採血により屠殺し、血清および組織 (肝臓、脂肪組織) を採取した。

【結果】4 群とも成長量、摂食量、肝臓重量に差は見られなかったが、LA 群と比較して TG 群と 8C8 群で有意に総脂肪組織重量が低かった。C88 群では低い傾向にあったが有意ではなかった。CLA 摂取の 3 群では肝臓 TG 濃度に 3 群全てにおいて有意な低下が見られたが、3 群間の差はほとんどなかった。血清 TG 濃度は CLA 摂取の 3 群で低い傾向にあった。血清および肝臓のコレステロール、リン脂質濃度は各群間で差はなかった。脂肪酸合成系酵素 (脂肪酸合成酵素、リンゴ酸酵素、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) の活性は各群で差がなかったが、 $\beta$  酸化系酵素 (カルニチンパイルミトイルトランスフェラーゼ、アシル CoA オキシダーゼ) の活性では CLA 摂取群で有意に上昇がみられた。CLA 摂取の 3 群でアディポネクチン濃度は高い傾向があり、レプチン濃度は低い傾向があった。肝臓総脂質の脂肪酸組成分析の結果、CLA 摂取群の CLA 含量はほぼ同程度であり、取り込みに違いは認められなかった。

以上の結果から CLA の体脂肪減少作用は認められたが、構造脂質間では有意な差がほとんど見られず、CLA 結合位置の違いは脂質代謝に大きな影響を与えないと考えられた。

## 8)

### CLAによる低酸素ストレス応答抑制

山崎正夫、松山哲也、池保有理、西山和夫  
(宮崎大学農学部)

【目的】固形腫瘍において、腫瘍組織の増大には盛んな血管新生を伴う。その原動力となるのは組織内部が低酸素状態となることであり、腫瘍細胞の低酸素環境への応答抑制は抗腫瘍効果における有用な標的であると考えられる。このような低酸素応答において、最も上流に位置する酸素センサータンパクとして hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) がある。本タンパクは HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$  のヘテロ 2 量体で構成される転写因子で、通常の酸素分圧下では HIF-1 $\alpha$  が積極的に分解されるため不活性な状態にある。そこで、本研究においては低酸素状態での HIF-1 $\alpha$  安定化に及ぼす CLA の影響を検討した。

【方法】低酸素応答への影響はヒト肝がん細胞株 HepG2 を用いた。サンプルとして *cis9*, *trans11*-CLA, *trans10*, *cis12*-CLA およびリノール酸を用いた。培養条件として通常酸素条件下 (20% O<sub>2</sub>), 低酸素条件下 (1% O<sub>2</sub>), HIF-1 $\alpha$  プロリン水酸化阻害条件下 (150  $\mu$ M 塩化コバルト添加) で実験を行なった。いずれの実験においても CLA 刺激を 24 時間行なった後、低酸素およびプロリン水酸化阻害条件での培養を開始した。HIF-1 $\alpha$  レベルは western blot, vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生量は ELISA 法で測定した。

【結果】低酸素条件下での培養およびプロリン水酸化阻害により、HepG2 細胞において HIF-1 $\alpha$  の安定化が認められた。また、これらの条件においては処理後 48 時間には培養上清中に 1 ng/ml 程度の VEGF の蓄積が認められた。これらの低酸素ストレス誘導条件における CLA の影響を検討したところ、*trans10*, *cis12*-CLA が HIF-1 $\alpha$  の安定化および VEGF 産生を抑制することが示された。

【考察】*trans10*, *cis12*-CLA は肝がん細胞での低酸素ストレス応答を抑制することが示唆された。低酸素応答には血管新生だけでなく、解糖系の活性化、アポトーシスの抑制などの関与しており、様々な分子を標的として抗腫瘍効果を発揮することが期待される。

## 9)

### CLA の肝癌細胞増殖抑制作用と ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)の関係

○柴田央<sup>1</sup>、都築毅<sup>2</sup>、宮澤陽夫<sup>1</sup>（東北大院農<sup>1</sup>、宮城大・食産業<sup>2</sup>）

【目的】共役リノール酸（CLA）は、様々な生理機能が報告されている。我々は、CLA が脂質過酸化を伴わずにヒト肝癌由来培養細胞株の増殖抑制が起こることを以前に報告している[1]。また、CLA はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)のリガンドとなることが報告されている。しかしながら、PPARs のリガンドが肝癌を誘発することが報告されている。そこで、ヒト肝癌由来培養細胞株に対して異性体別の影響を確認するとともに、PPAR との関わりについて検討した。

【方法】CLA の各異性体についてヒト肝癌培養細胞株（HepG2, PLA/PRF/5, Hep3B, HuH-7）を用いて、細胞増殖に及ぼす影響を観察した。また、各細胞の PPARs の発現を確認するとともに、それぞれの特異的なリガンドが細胞増殖に与える影響を観察した。また、PPARs の標的遺伝子の発現について観察した。

【結果・考察】いずれの細胞においても 9c,11t-CLA に比べ 10t,12c-CLA の増殖抑制効果が強かった。また、試験に使用した細胞で PPARs の発現が確認できた。Wy14643 (PPAR $\alpha$ のリガンド) は細胞増殖に影響がみられず、Bezafibrate (PPAR $\beta$ のリガンド) では増殖促進が確認された。15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> および Ciglitazone (PPAR $\gamma$ のリガンド) では増殖抑制が観察された。また、PPAR $\gamma$ のアンタゴニストである GW9662 でも増殖抑制効果が観察された。10t,12c-CLA と GW9662 の同時添加によってさらに強い増殖抑制効果が誘導された。10t,12c-CLA と Ciglitazone の同時添加も増殖抑制効果をやや増強する結果となった。これにより 10t,12c-CLA は PPAR $\gamma$ リガンドと作用点が違っているように考えられた。そのため、10t,12c-CLA と PPAR $\gamma$ の関係を調べるため、PPAR $\gamma$ や PPAR $\gamma$ によって誘導される CD36 や LXR $\alpha$  の mRNA 発現量を測定したところ、10t,12c-CLA 添加により有意に減少した。ウェスタンブロット法により PPAR $\gamma$ と肝細胞の分化の指標であるアルブミン量を測定したところ、10t,12c-CLA は濃度依存的に PPAR $\gamma$ 量を減少させ、アルブミン量を増加させた。したがって、10t,12c-CLA は PPAR $\gamma$ の上流で作用し、肝癌細胞の分化を促進し、PPAR $\gamma$ の発現を抑制することで肝癌細胞増殖を抑制する可能性が考えられた。そして、肝癌細胞増殖抑制は、PPAR $\gamma$ の機能を低下させることが重要であることが示唆された。また、10t,12c-CLA の肝癌細胞種間での増殖抑制効果の違いは、PPAR $\gamma$ の発現量に左右されることが示唆された。

[1]M. Igarashi et al., Biochim. Biophys. Acta, 1530, 162-171, 2001

## 10)

### 海藻に含まれる共役型高度不飽和脂肪酸

朴 時範<sup>1</sup>・遠藤 泰志<sup>1</sup>・池田 郁男<sup>1</sup>・藤本 健四郎<sup>2</sup>  
(東北大学大学院農学研究科<sup>1</sup>・郡山女子大学家政学部<sup>2</sup>)

#### 【目的】

乳製品中の共役リノール酸(CLA)や桐油、ニガウリ種子油などの植物種子に含まれる共役型ポリエン酸(CPUFA)は抗発癌作用や体脂肪蓄積抑制作用などの様々な生理活性を有することが研究されており、関心が高まっている。一方、海藻中にも様々な CPUFA が存在していることが報告されているものの、その含量はごくわずかであり、CLA のような様々な生理活性についてはほとんど研究されていない。我々の研究室では北海道産の紅藻 *Ptilota pectinata* 中に共役型脂肪酸が微量に含有されていることを明らかにした。これにより、*P. pectinata* 中には非共役型高度不飽和脂肪酸(NCPUFA)を CPUFA に異性化する酵素(PFI)が存在する可能性が示唆された。そこで、本研究では *P. pectinata* からポリエン酸異性化酵素(PFI)を単離し、その酵素を用いて CPUFA を合成し、構造同定やヒト由来癌細胞に対する毒性について検討した。

#### 【方法】

*P. pectinata* を 100mM リン酸緩衝液でホモシナイズし、遠心分離後、50~90% 硫酸沈殿画分、透析、凍結乾燥し、粗酵素を得た。アラキドン酸(AA)とエイコサペンタエン酸(EPA)を基質とし、酵素反応による生成物を HPLC, GC-MS および NMR で分析した。さらに精製した CPUFA を用いてヒト由来癌細胞(HepG2、DLD-1、HT-29 および A-549)に対する増殖抑制効果を調べた。

#### 【結果および考察】

紅藻 *P. pectinata* からの PFI は炭素数 20 及び  $\Delta 5$  位置に二重結合を持つ脂肪酸、特に EPA、AA に基質特異性が高かった。基質として EPA から 5Z, 7E, 9E, 14Z, 17Z-EPA と 5E, 7E, 9E, 14Z, 17Z-EPA が、AA からは 5Z, 7E, 9E, 14Z-AA と 5Z, 7E, 9E, 14Z-AA が生成することが明らかになった。本酵素により生成した共役型 EPA と共役型 AA は肝臓癌細胞 HepG2 に対して選択的に低濃度 (6.25  $\mu$ M) で強い殺癌細胞効果が認められた。

## 11) 共役リノレン酸のラット小腸における共役リノール酸への代謝転換

○都築毅<sup>1</sup>、川上祐生<sup>2</sup>、仲川清隆<sup>2</sup>、古場一哲<sup>3</sup>、今村順<sup>4</sup>、岩田敏夫<sup>5</sup>、池田郁男<sup>6</sup>、

宮澤陽夫<sup>2</sup>（宮城大・食産業<sup>1</sup>、東北大院・農<sup>2</sup>、長崎シーボルト大・看護栄養<sup>3</sup>、玉川大・農<sup>4</sup>、日清オイリオグループ<sup>5</sup>、東北大院・農・生体分子機能学<sup>6</sup>）

【目的】リノール酸の幾何・位置異性体である共役リノール酸（CLA）には、抗肥満効果や抗腫瘍性が既に知られている。一方、天然にはCLA以外の共役脂肪酸も存在する。我々は、それらCLA以外の共役脂肪酸に着目し、CLAと比較しながら生体内外でその機能を評価してきた。そして最近、キリやニガウリ種子に含まれている共役トリエン型脂肪酸である $\alpha$ -エレオステアリン酸（ $\alpha$ -ESA; 9c,11t,13t-18:3）を含む食餌をラットに摂取させたところ、9c,11t-CLAに代謝されることを明らかにした[1]。我々は、脂肪酸のメチル基側が飽和化される特異な現象に興味を持ち、この反応が補酵素であるNADPH依存性であること、腸内細菌ではなくラット吸収後に行われることを明らかとした[2]。これにより、 $\alpha$ -ESAは生体内で優れたCLA供給源になることが考えられ、 $\alpha$ -ESAにCLAと同じような生理機能が期待できた。そして我々は、 $\alpha$ -ESAの癌抑制効果を*in vivo*や*in vitro*で明らかにした[3]。しかし、 $\alpha$ -ESAはCLAより強力にマウスの癌を抑制した。これにより、 $\alpha$ -ESAは吸収される時に大部分がそのまま吸収されCLAより強力な効果を発揮していることが考えられた。そこで、本研究では $\alpha$ -ESAを投与したラットのリンパを回収し、どの程度CLAに代謝されるかを明らかにしようとした。また、 $\alpha$ -ESAの幾何異性で飽和化反応を受ける $\Delta 13$ 位がシス体であるプニカ酸（PA; 9c,11t,13c-18:3）も検討した。

【方法と結果】SDラット（雄性、9週齢）の胸管にカニューレーション手術を行い、24時間後胃内にエマルジョンに調製したサンプル油脂[ $\alpha$ -ESA, PA, CLA,  $\alpha$ -リノレン酸（ $\alpha$ -LnA）]を投与した。その後、24時間まで経時的にリンパを回収しGC分析により脂肪酸量を定量した。PAを投与したラットのリンパでPAより転換したCLAが確認され、この脂肪酸の化学構造を<sup>13</sup>C-NMRとGC-EI/MSを用いて、9c,11t-18:2と決定した。 $\alpha$ -ESAとPAは小腸でCLAに代謝されるのでリンパ回収量は $\alpha$ -ESAまたはPAとCLAの合計で算出した。投与した $\alpha$ -ESA、PA、CLA、 $\alpha$ -LnAは24時間後にそれぞれ90%以上の高い回収率を示した。CLAと $\alpha$ -ESA、PAは投与後早い時間では $\alpha$ -LnAより回収量が少なかったが、24時間後の回収量に差はなかった。投与したCLAと回収されたCLAの組成に差はなく、CLAの構造の違いは小腸での吸収速度にそれほど影響を与えないことが明らかとなった。 $\alpha$ -ESAより転換したCLAは約20%で、PAより転換したCLAは約10%であった。これより、 $\alpha$ -ESAとPAは大部分が代謝を受けずにそのまま体内へ吸収されることが明らかとなった。また、代謝部位（ $\Delta 13$ 位）がシス体よりトランス体の方が約2倍、代謝されやすいことが明らかとなった[4]。

[1] T. Tsuzuki et al., J. Nutr. Sci. Vitaminol., 49,195-200 (2003)

- [2] T. Tsuzuki et al., *J. Nutr.*, 134, 2634-2639 (2004)
- [3] T. Tsuzuki et al., *Carcinogenesis*, 25, 1417-1425 (2004)
- [4] T. Tsuzuki et al., *J. Nutr.*, 136, 2153-2159 (2006)